

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET  
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 153882 B



(21) Patentansøgning nr.: 1948/83

(51) Int.Cl.<sup>4</sup> C 07 D 407/06

(22) Indleveringsdag: 02 maj 1983

(24) Løbedag: 18 maj 1979

(41) Alm. tilgængelig: 02 maj 1983

(44) Fremlagt: 19 sep 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 2065/79

(30) Prioritet: 20 maj 1978 GB 20958/78

(71) Ansøger: \*BEECHAM GROUP LIMITED; Beecham House; Great West Road; Brentford; Middlesex, GB

(72) Opfinder: Alan David \*Curzons; GB

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af pseudomonsyre

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

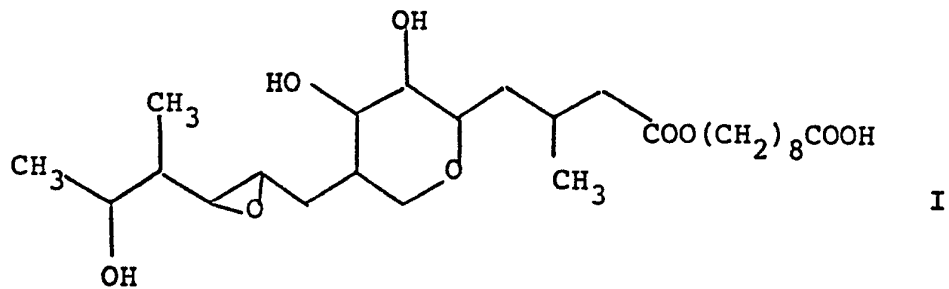
1948-83

Der fremstilles pseudomonsyre ved at lithiumpseudomonat, der eventuelt er isoleret ved ekstraktion fra et dyrkningsmedium indeholdende pseudomonsyre, hydrolyseres. Dyrkningsmediet er fortrinsvis et medium, på eller i hvilket der er dyrket pseudomonsyreproducerende bakteriestammer, især Pseudomonas fluorescens NCIB 10586.

DK 153882 B

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af pseudomonsyre.

Pseudomonsyre er forbindelsen med formelen I



Det beskrives i britisk patentskrift nr. 1.395.907, at denne forbindelse har antibakteriel virkning, og at den derfor er værdifuld i 5 behandlingen af bakterielle infektioner i mennesker og dyr. Den fremgangsmåde, der beskrives i britisk patentskrift nr. 1.395.907 til fremstilling af pseudomonsyre, omfatter isolering af en blanding, der indeholder de principielle aktive syrebestanddele fra et dyrknings- 10 medium, hvorpå eller hvori *Pseudomonas fluorescens* er dyrket under aerobe betingelser. Det første trin i fler-trinsfremgangsmåden består i, at urenheder udfældes fra kulturopløsningen ved tilsætning af bariumioner. Dette trin er ifølge det i det britiske patentskrift beskrevne et væsentligt trin. Pseudomonsyren forbliver i opløsningen og 15 renses derefter yderligere ved ekstraktion i et organisk opløsningsmiddel. Efter tilbageekstraktion med vand kan der fås salte af pseudomonsyre, og i det britiske patentskrift nævnes specifikt natriumsaltet. Pseudomonsyre kan derefter dannes ud fra saltet.

Den foreliggende opfindelse bygger på den erkendelse, at anvendelse 20 af bariumioner kan udelades, når der anvendes lithiumsalt. Denne fordelagtige udeladelse skyldes lithiumsaltets uventede egenskaber, idet lithiumpseudomonat udfældes i en meget ren, stabil krystallinsk

form. Pseudomonsyre fremstilles ifølge opfindelsen ved hydrolyse af lithiumpseudomonsyre.

Lithiumsaltet af pseudomonsyre (i det efterfølgende benævnt lithiumpseudomonat) er en hidtil ukendt forbindelse. Selv om natriumsaltet af pseudomonsyre beskrives i britisk patentskrift nr. 1.395.907, er anvendelsen af lithiumsaltet hverken beskrevet eller gjort nærliggende derved. Medens natriumsaltet, som er det nærmest beslægtede alkali-metalsalt, er en amorf og hygroskopisk forbindelse, er lithiumpseudomonat overraskende stabilt, krystallinsk og ikke-hygroskopisk.

10 Desuden er lithiumsaltet langt mindre opløseligt end natriumsaltet. Disse egenskaber kunne ikke forudsiges på grundlag af britisk patentskrift nr. 1.395.907 og gør lithiumpseudomonat til et nyttigt mellemprodukt til isoleringen eller rensningen af pseudomonsyre.

Lithiumpseudomonat kan fremstilles ved, at et råpræparat, der indeholder pseudomonsyre, ekstraheres med et polært, organisk, med vand ikke-blandbart opløsningsmiddel, hvori pseudomonsyre er opløselig, ekstrakten behandles med et lithiumsalt, som er i det mindste lidt opløseligt i det med vand ikke-blandbare opløsningsmiddel, og det resulterende lithiumpseudomonat isoleres.

20 Lithiumpseudomonatet kan derpå hydrolyseres til den fri syre, pseudomonsyre, eller det kan omdannes til et andet salt deraf ved konventionelle teknikker.

Det er særlig hensigtsmæssigt at isolere pseudomonsyre i form af sit lithiumsalt fra et dyrkningsmedium, hvorpå eller hvori pseudomonsyreproducerende bakteriestammer er dyrket. I dette tilfælde gås der mest hensigtsmæssigt frem på den nedenfor beskrevne måde.

En pseudomonsyreproducerende bakterie, i almindelighed en bakteriestamme af slægten *Pseudomonas*, dyrkes ved en standardmetode under aerobe betingelser i eller på et egnet dyrkningsmedium. Sådanne dyrkningsmedier er almindeligt kendte og indeholder uorganiske salte og kilder for assimilerbart nitrogen og carbon. Det er mest hensigtsmæssigt at anvende bakterien *Pseudomonas fluorescens*. En egnet

30

offentlig tilgængelig stamme er *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586. Mikroorganismen lades vokse, indtil der er en passende mængde pseudomonsyre til stede i dyrkningsmediet. Faste partikler kan derpå fjernes fra mediet ved filtrering eller centrifugering, hvorved fås en  
 5 klar væske. Den klare væskes pH-værdi indstilles til 3,0-5,0, hensigtsmæssigt ca. pH-værdi 4,5.

Denne syrnede vandige opløsning ekstraheres derpå med et polært, organisk, med vand ikke-blandbart opløsningsmiddel. Der foretrækkes aprotiske opløsningsmidler. Opløsningsmidlet bør have en tilstrækkelig  
 10 polaritet til at opløse pseudomonsyren i tilstrækkelig grad. Egnede opløsningsmidler er f.eks. ethylacetat, butanol, methylisobutylketon (MIBK) eller methyldichlorid. Der kan alternativt anvendes blandede opløsningsmidler, f.eks. ether, der indeholder ca. 5% ethanol. Et foretrukket opløsningsmiddel er methylisobutylketon.

15 Det volumen opløsningsmiddel, der anvendes til ekstraktionen, bør holdes på et minimum, medens der sikres god fysisk adskillelse mellem de to faser. Når der ekstraheres en dyrkningsvæske, er et passende volumen fra 1/2 til 1/6, fortrinsvis 1/4 af volumen af den væske, der skal ekstraheres.

20 Det er ofte fordelagtigt at vaske ekstrakten med saltopløsning, f.eks. under anvendelse af et volumen på 1/10 af ekstraktvolumenet for at reducere vandmængden i ekstrakten.

Det næste trin i fremgangsmåden er at behandle ekstrakten med et  
 25 lithiumsalt. Det anvendte lithiumsalt bør ideelt være mere opløseligt i opløsningsmidlet end lithiumpseudomonat. Det er fortrinsvis lithiumsaltet af en organisk carboxylsyre, f.eks. et salt af en alkansyre med den almene formel II



30 hvor R betegner en alkylgruppe, der f.eks. indeholder fra 1 til 20 carbonatomer, fortrinsvis fra 1 til 8 carbonatomer.

Eksempler på egnede lithiumsalte er acetatet, propionatet og hexanoatet, idet et foretrukket salt er lithium-2-ethylhexanoat.

Lithiumsaltet kan sættes til ekstrakten i fast form, men det foretrækkes at tilsætte det som en koncentreret opløsning i et co-opløsningsmiddel, som opløser lithiumsaltet, men som i det væsentlige ikke solubiliserer lithiumpseudomonat. Sådanne co-opløsningsmidler er f.eks. ethanol og, fortrinsvis, methanol.

Det foretrækkes almindeligvis at anvende ca. 10%'s overskud af lithiumsalt og langsomt at tilsætte en opløsning af saltet til ekstrakten. I de fleste tilfælde vil lithiumpseudomonatet krystallisere ud, en proces, som lettes ved at afkøle til ca. 0-5°C. Lithiumpseudomonatet kan isoleres ved konventionelle teknikker. Det kan være fordelagtigt, efter isoleringen af den første mængde lithiumpseudomonat, at koncentrere og isolere et yderligere udbytte.

Da lithiumpseudomonat ikke er hygroskopisk, kan det tørres i en luftovn. Dette er ikke muligt med natriumpseudomonat og heller ikke med pseudomonsyre selv, som det er vanskeligt at tørre på anden måde end i en vakuumovn eller meget forsigtigt ved lav temperatur.

Lithiumpseudomonatet hydrolyseres til den fri syre selv ved konventionelle teknikker, f.eks. ved syrning og ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse belyses nærmere ved nedenstående eksempel.

#### EKSEMPEL

Isolering af lithiumpseudomonat.

Et dyrkningsmedium, der indeholder pseudomonsyre, syrnes til pH-værdi 4,5 under anvendelse af 20%'s saltsyre og ekstraheres med 1/4 af sit eget volumen methylisobutylketon. Methylisobutylketonekstrakten vaskes med 1/10 af sit eget volumen mættet saltopløsning. Pseudomonsyreindholdet er i dette trin 2500 µg/ml og vandindholdet er 1,0%.

Til 10 liter af methylisobutylketonekstrakten sættes dråbevis en opløsning af 9,0 g lithiummethylhexanoat i 35 ml methanol i løbet af 0,5 time ved stuetemperatur, og blandingen omrøres i yderligere 1 time ved 20°C og derpå i 1 time ved 5°C. Det udfældede produkt isoleres ved filtrering, vaskes med methylisobutylketon og lufttørres ved 50°C, hvorved fås 26,5 g (90% af det teoretiske) lithiumpseudomonat, smeltepunkt 169°C, renhed 87%.

Omdannelse til pseudomonsyre.

10 g af det ovenfor vundne lithiumpseudomonat opløses i 200 ml vand. Der tilsættes 85 ml methylisobutylketon, og pH-værdien indstilles til 4,0 med 4N saltsyre.

Den øvre methylisobutylketonfase fraskilles og tørres over vandfrit natriumsulfat, og den frie syre udfældes ved tilsætning af 130 ml heptan. Efter afkøling til 5°C isoleres pseudomonsyre ved filtrering. Herved fås 8,0 g (85% af det teoretiske), smeltepunkt 77-78°C, renhed 90%.

#### PATENTKRAV

Fremgangsmåde til fremstilling af pseudomonsyre,  
k e n d e t e g n e t ved, at lithiumpseudomonat hydrolyseres.